Aus dem Hygienischen Institut der Universität Basel
(Vorsteher: Prof. Dr. R. Doerr)

Die Durchlässigkeit der Blut-Liquor-Schranke und der Placenta für Bakteriophagen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der
Medizinischen Fakultät der Universität Basel

Vorgelegt von

Karl Burckhardt
aus Basel

Wien 1939

Von der Medizinischen Fakultät genehmigt auf Antrag
von Prof. Dr. R. Doerr

Tag der Promotion: 23. Dezember 1938

P UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Abdruck aus
Archiv für die gesamte Virusforschung, Bd. I, Heft 1, 1939
Verlag von Julius Springer in Wien

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546709_0067

Aus dem Hygienischen Institut der Universität Basel.
Vorsteher: Prof. Dr. *R. Doerr.*

Die Durchlässigkeit der Blut-Liquor-Schranke und der Placenta für Bakteriophagen.

Von

K. Burckhardt.

Die herrschenden Vorstellungen über den Mechanismus der Infektion des Zentralnervensystems durch neurotrope Virusarten stehen unter dem Einfluß der Lehre von der Impermeabilität der Blut-Hirn-Schranken. Für Gebilde von der Größenordnung der Viruselemente soll diese Barriere unpassierbar sein. Eine hämatogene Infektion des Gehirnes oder Rückenmarkes wäre demzufolge aus rein mechanischen Gründen unmöglich; der Weg zu den nervösen Zentralorganen wird daher konsequenterweise in die peripheren Nerven verlegt, u. zw. auch dann, wenn eine Virusseptikämie besteht oder wenn eine intravenöse Virusinjektion im Tierexperiment zu einer Encephalitis oder Myelitis führt.

Als einzige Ausnahme wird von den Anhängern dieser Richtung das „*Durchwachsen*" virusartiger Infektionsstoffe durch die Wände kapillarer Gefäße des Gehirnes oder des Rückenmarkes zugestanden. Daraus geht klar hervor, daß die Blut-Hirn-Schranken als Filter aufgefaßt werden, und daß man hier wie bei den bakteriendichten Hartfiltern der Laboratorien *zwei* Arten des Durchtretens vermehrungsfähiger Keime unterscheiden möchte, welche von den Dimensionen der im Filtrans vorhandenen Keime in verschiedener Weise abhängen, nämlich das *Durchpressen* durch den Filtrationsdruck und das *Durchwuchern* durch fortschreitende Vermehrung in den Filterporen. Bekanntlich können Filterkerzen von beweglichen und unbeweglichen Bakterien regelmäßig und relativ rasch durchwachsen werden, für welche sie im Filtrationsversuch völlig undurchlässig sind. Eine analoge Beziehung wird auch für das Verhalten der Blut-Hirn-Schranken gegenüber zirkulierenden Viruselementen angenommen, nur daß man in diesem Falle eine weit größere Dichte der filtrierenden Apparate voraussetzt, da noch die Elemente des Poliomyelitisvirus, die bei sphärischer Konfiguration einen Durchmesser von 12 mμ besitzen, sicher zurückgehalten werden sollen.

Es soll hier nicht erörtert werden, daß und warum der Vergleich zwischen natürlichen Schranken (Placenta, Darmbarriere, Blut-Hirn-Schranke) und den im Laboratoriumsexperiment benutzten Filtern unzulässig ist. Der Hinweis auf die Bemerkungen von *R. Doerr* im Lehrbuch der inneren Medizin (3. Aufl., S. 88) und die ausführliche Darstellung im Handbuch der Virusforschung, II. Teil (derzeit noch im Druck), mag genügen. Beabsichtigt ist an dieser Stelle lediglich die experimentelle Beantwortung der Frage, ob eine Passage von Viruselementen durch natürliche Schranken — gewählt wurden die *Blut-Liquor-Schranke* und die *Placenta* — stattfindet oder nicht. Mit Rücksicht auf die eingangs erwähnten hypothetischen Antezedentien schien eine Vereinfachung in dem Sinne angezeigt, daß das „Durchwachsen" der Schranken als Erklärung für etwaige positive Resultate a priori ausgeschlossen werden konnte. Diese Forderung läßt sich auf doppelte Weise befriedigen, nämlich 1. durch die intravenöse Injektion von Virusarten, welche sich im Versuchstier wegen seiner natürlichen Unempfänglichkeit nicht zu vermehren vermögen, oder 2. durch die Verwendung von Bakteriophagensuspensionen, da die Bakteriophagen nur in Gegenwart proliferierender lysosensibler Bakterien an Menge zunehmen. Nach neueren Angaben von *A. P. Krueger* sollen sich zwar Staphylokokkenphagen auch in Ultrafiltraten der Bouillonkulturen lysinempfindlicher Kokken in geringem Grad (auf das Doppelte) vermehren; aber diese Ergebnisse, die mit einer besonderen und ziemlich komplizierten Technik erzielt würden, sind vorläufig nicht hinreichend beglaubigt (vgl. *D. Högger*) und kommen für die Versuchsanordnungen, durch welche die Passage nachgewiesen werden sollte, naturgemäß nicht in Betracht.

Aus der Blutbahn natürlich immuner Tiere (Warm- oder Kaltblüter) schwinden die Virusarten außerordentlich rasch. *R. Doerr* und *R. Pick* konnten zeigen, daß Hühnerpestvirus, wenn man dasselbe in der Form von virushaltigem Serum infizierter Hühner in die Venen von Kaninchen, Meerschweinchen oder Fröschen einspritzt, schon nach 1—2 Stunden im Blute nicht mehr nachzuweisen ist, selbst wenn sehr große Quantitäten in die Zirkulation eingeführt wurden. An Hühnererythrocyten angelagert, hält sich das Virus im Blute der gleichen Tierspezies allerdings länger als 24 Stunden (*R. Doerr* und *R. Pick*); die sorptive Bindung an große Zellen könnte aber selbstverständlich den Übertritt der Viruselemente aus dem Blute des Versuchstieres in den Liquor oder in das Fruchtwasser bzw. in das Blut des Fetus verhindern.

Die Bakteriophagen bieten in dieser Beziehung günstigere Verhältnisse. Die Konzentration intravenös injizierter Phagen im Blute nimmt zwar ebenfalls rapid ab; innerhalb von 6—24 Stunden konnte *A. Werthemann* ein Absinken des Phagentiters auf $^1/_{100}$ bis $^1/_{1000}$ des unmittelbar nach der intravenösen Injektion bestimmten Wertes feststellen. Das

Tempo ist aber doch im Vergleich zum Verhalten des Hühnerpestvirus wesentlich verzögert und es bleibt vor allem im Blute lange Zeit hindurch ein genügender Phagenspiegel erhalten, um einen Austritt von Phagenelementen zu gestatten.

Ferner schwanken die Dimensionen der Phagenstämme in ziemlich weiten Grenzen. Ein und demselben Phagenstamm kommt, falls er rein ist, in der Regel eine einheitliche Partikelgröße zu; die Durchmesser der Elemente verschiedener Phagen zeigen dagegen Abstufungen von 10 mμ (Staphylococcus-Bakteriophage von *Northrop*) bis zu 90 mμ (*Elford* und *Andrewes, Paic, Krassnoff, Haber, Reinie* und *Voët* u. a.; vgl. insbesondere die Zusammenstellung von *W. I. Elford*, Handb. d. Virusf., I, S. 179). Daraus ergibt sich die Möglichkeit, mit Phagen von verschiedener Größe zu experimentieren bzw. zu untersuchen, ob die Passage durch natürliche Schranken von der Größe der ins Blut gebrachten Elemente abhängig ist. Daß sich verschiedene Phagen verschieden verhalten können, wurde von *T. Nakagawa* behauptet (siehe weiter unten), und es wäre daher wichtig, festzustellen, ob der dimensionale Faktor im Sinne der Vorstellung eines Filtrationsvorganges maßgebend ist oder ob irgendwelche andere Momente ausfindig gemacht werden können, welche die Differenzen der Versuchsresultate mit verschiedenen Phagen bestimmen. In der vorliegenden Mitteilung wurde dieser Teil des Programms noch nicht erledigt. Wir beschränkten uns zunächst auf den *Colibakteriophagen S.* (dessen Teilchengröße, als Durchmesser bestimmt, etwa das 4—5fache der Elemente des Poliomyelitisvirus betragen dürfte), um einen Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen zu gewinnen.

Bevor wir auf die Technik und die Ergebnisse der ausgeführten Experimente eingehen, seien einige der wichtigeren Arbeiten erwähnt, welche sich mit demselben Thema befaßten.

So kam *Klieneberger* auf Grund ihrer Untersuchungen über die „Passage von Bakteriophagen innerhalb des Organismus" zu folgenden Resultaten: Die Zahl der im Blut kreisenden Bakteriophagenteilchen nahm kurze Zeit nach der intravenösen Einverleibung beträchtlich ab. Bis zum 6. Tag konnten jedoch noch Spuren nachgewiesen werden. (Diese Resultate bestätigen die schon zitierten, von *Werthemann* erzielten Ergebnisse.) Die Blut-Liquor-Schranke wurde nur von geringen Phagenmengen „durchbrochen"; in einem Versuche konnte ungefähr der zehnte Teil des im selben Zeitpunkt in der gleich großen Blutmenge vorhandenen Lysins im Liquor festgestellt werden.

Die Versuche von *Winkler* gingen darauf hinaus, Störungen im Bereich der Blut-Liquor-Schranke nach vaccinaler Infektion festzustellen. Als Testobjekt für die Durchgängigkeit verwendete er Bakteriophagen und wies nach, daß der Phage nach Vaccination rascher in den Liquor übertrat als bei den nichtinfizierten Tieren. Seiner Ansicht nach könnte dieses Ergebnis für die Pathogenese encephalitischer Erkrankungen nach Vaccination Bedeutung haben.

Kasahara und *Uyeshima* fanden, daß die intravenös injizierten Phagen bei gesunden Kaninchen regelmäßig in den Liquor übergingen und sich

20 Stunden lang nach der Einverleibung nachweisen ließen. Bis zu einem gewissen Grade war die „Durchlässigkeit der Blut-Liquor-Schranke" vom Alter der Kaninchen abhängig; ferner ließ sie sich durch Erzeugung einer aseptischen Meningitis vergrößern.

Von den Arbeiten über die *Durchgängigkeit der Placenta für Bakteriophagen* wären anzuführen:

Grasset injizierte große Mengen von Colibakteriophagen in den Kreislauf gravider Kaninchen und Meerschweinchen. Nach einigen Stunden entblutete er die Tiere und untersuchte mütterliches und fetales Blut auf seinen Phagengehalt. Der Nachweis von Phagen im Fetalblut gelang ihm nie, während das mütterliche Blut noch in Verdünnungen von 1:1000 lytische Wirkung zeigte. Aus diesen Versuchen zog er den Schluß, daß die Placenta für Bakteriophagen nicht durchgängig sei.

Zum gleichen Resultat führten die Untersuchungen von *Nattan-Larrier, Eliava* und *Richard*. Auch ihnen gelang der Nachweis des Phagen im fetalen Blut nach Injektion in den Kreislauf des Muttertieres nicht, obwohl das von ihnen verwendete Lysin einen höheren Titer besaß als dasjenige, welches *Grasset* benutzte.

Im Gegensatz dazu stehen die Versuchsergebnisse von *Blair* und *Reeves*, denen es gelang, Typhus-, Coli- und Dysenteriephagen im Kreislauf und im Darminhalt von Feten nachzuweisen, deren Mütter größere Mengen dieser Phagen intraperitoneal oder subcutan erhielten. Die intraperitoneale Injektion ist allerdings wegen der Möglichkeit einer direkten Verimpfung von Phagen in die Frucht nicht einwandfrei; die positiven Resultate nach subcutaner Injektion sprechen aber für den Durchtritt der Phagen durch die Placenta. In den Feten von Kaninchen, welchen keine Phagen injiziert worden waren oder welche die phagenhaltigen Flüssigkeiten per os erhalten hatten, konnte das verwendete Lysin nicht festgestellt werden.

Nakagawa untersuchte das Verhalten *verschiedener* Phagen gegenüber der Placenta. Nach seinen Angaben können nur Coliphagen, nicht aber Dysenterie- oder Typhusphagen passieren, falls nicht besondere, die Durchlässigkeit der Placenta steigernde Mittel angewendet werden. Die Äthernarkose soll den Durchtritt von Typhusphagen ermöglichen, während Dysenteriephagen auch unter diesen Umständen weder im Fruchtwasser noch im Fetus nachweisbar sind. Die Zeit, welche Coliphagen unter normalen Verhältnissen benötigen, um aus dem mütterlichen Blut in das Fruchtwasser und in den Fetus in feststellbarer Konzentration überzutreten, soll 4 Stunden betragen. Leider hat *Nakagawa* seine Phagenversuche nur ganz summarisch wiedergegeben, so daß ihre Beurteilung ohne eingehende Nachprüfung kaum möglich erscheint. Etwas ausführlicher lautet der Bericht des Autors über analoge Experimente mit einer Reihe anderer Testobjekte (pathogene und apathogene Bakterien, Spirochaeta morsus muris, Rickettsia nipponica und Vaccinevirus). In keinem Falle konnte ein Durchgang von apathogenen Bakterien sowie merkwürdigerweise auch von Dysenteriebacillen (siehe oben) beobachtet werden, obzwar ausdrücklich betont wird, daß die Passage nicht unbedingt an das Vorhandensein pathologischer Veränderungen der Placenta gebunden war. Jedenfalls aber wirft der in zahlreichen Einzelversuchen konstatierte Durchgang so großer Gebilde, wie Staphylokokken, Streptokokken, Colibakterien oder Diphtheriebacillen, ein Licht auf die Vorstellung, daß die Placenta, wie dies unter anderen auch *Calmette* für statthaft hielt, mit den Filtern der Laboratorien hinsichtlich ihrer Permeabilität verglichen werden darf.

Diese Übersicht über das einschlägige Schrifttum lehrt, obwohl sie keinen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt, daß zahlreiche Widersprüche und Lücken bestehen, welche eine nochmalige Bearbeitung des Themas rechtfertigen. Aus äußeren Gründen erfolgt die Mitteilung der nachstehenden Versuche, obgleich sie, wie schon an anderer Stelle betont wurde, nur als Einleitung zu späteren ausführlichen Studien aufzufassen ist.

Eigene Untersuchungen.

Der verwendete *Coliphage S.* war in Kulturlysaten in hoher Konzentration nachweisbar, eine Eigenschaft, welche *T. Nakagawa* als unerläßliche Vorbedingung bezeichnet, wenn der Übertritt aus dem mütterlichen Blut in das Fruchtwasser bzw. in die fetale Zirkulation nachweisbar werden soll. Ein hoher Titer der Phagensuspensionen bietet ferner den Vorteil, daß man nicht allzu große Volumina intravenös injizieren muß, um im Blute des Versuchstieres eine genügende Lysinkonzentration herzustellen. Die Kulturlysate enthalten ja die Desintegrationsprodukte der Bakterien, die stets, wenn auch in verschiedenem Grade, toxisch wirken, und es bestünde daher die Möglichkeit, daß sich durch diesen Faktor, wenn er ein gewisses Maß übersteigt, die Durchlässigkeit der natürlichen Schranken ändert.

Von später zu erwähnenden Fällen abgesehen, wurde der Phagengehalt sowohl in dem injizierten Kulturlysat als auch im Blut und im Liquor des Versuchstieres sowie im Fruchtwasser, im Blute und in den Organextrakten des Fetus *quantitativ* bestimmt.

Für die quantitative Phagenbestimmung stehen vier Hauptmethoden mit ihren Varianten zur Verfügung:

1. die Zählung der „taches vierges“ im Bakterienrasen;
2. die Dilutionsmethode nach *Appelmans* und *Werthemann*;
3. die Anreicherungen nach *Iwase, Nagai* und *R. Naito*;
4. die Auswertung nach *A. P. Krueger*.

Nach *A. P. Krueger* soll die von ihm angegebene Technik die besten Werte liefern, indem der mögliche Fehler nur $\pm 5\%$ beträgt. Das Verfahren ist jedoch bisher von anderer Seite nur in sehr kleinem Umfange nachgeprüft worden und ist infolge der vielen Ablesungen, der komplizierten Herstellung der Bakteriensuspension und der rechnerischen Verwertung der Ablesungsergebnisse viel zu umständlich, um die Untersuchung zahlreicher Proben in kurzer Zeit zu gestatten. Gerade darauf kam es aber bei unseren Untersuchungen an und wir entschieden uns daher für die ursprüngliche Dilutionsmethode von *Appelmans* und *Werthemann*, bei welcher die zu titrierenden Flüssigkeiten mit Nährbouillon nach Zehnerpotenzen fortschreitend verdünnt und sämtliche Verdünnungen mit kleinen und gleichen Mengen der lysosensiblen Bakterien (je

ein mit besonderer Kapillarpipette abgemessener Tropfen einer 14- bis 16stündigen Bouillonkultur) beimpft werden. Nach 8stündigem Aufenthalt bei 37° C wird die Ablesung vorgenommen; als Maß der Phagenkonzentration gilt die höchste Lysinverdünnung, welche (nach anfänglicher Trübung durch Bakterienwachstum) eine komplette Lyse ergibt.

Auf große Genauigkeit kann diese Art der Phagenauswertung allerdings keinen Anspruch erheben, vorzüglich aus dem Grunde, weil man bei der Anlegung der Verdünnungsreihen in jedes folgende Röhrchen nur ein Zehntel des Inhaltes des vorausgehenden Röhrchens überträgt. Hat die Phagendichte infolge der fortschreitenden Verdünnung so weit abgenommen, daß man sich in der Nähe der Grenze befindet, *so muß es vom Zufall abhängen*, ob das geschöpfte und in das folgende Röhrchen übertragene Zehntel, das gewissermaßen bloß eine „Stichprobe" darstellt, 0, 1, 2, 3 oder auch mehr Lysinteilchen enthält (vgl. hierzu das Kapitel „Die quantitative Bestimmung der Infektiosität der Virusarten" im Handbuch der Virusforschung, II. Teil). Die dadurch bedingten Fehler wurden mit Rücksicht auf den orientierenden Charakter der hier wiedergegebenen Versuche in Kauf genommen. *Prinzipielle* Änderungen der Resultate sind übrigens von der Anwendung genauerer Auswertungsverfahren, wie sich aus dem Folgenden ergibt, nicht zu erwarten.

Das Röhrchen mit dem unverdünnten Ausgangsmaterial wurde mit 0, die folgenden 10-, 100-, 1000fachen Verdünnungen mit 1, 2, 3 usw. bezeichnet. Diese Bezeichnungsweise hat vor der von *A. Werthemann* vorgeschlagenen den Vorteil, daß eine einheitliche, beim ersten Röhrchen beginnende Zahlenreihe resultiert, welche eine rasche Orientierung erlaubt (vgl. Handb. d. path. Mikroorg., 3. Aufl., 1. Band, S. 391).

In der Regel war das letzte klare von dem ersten trüben Röhrchen bei unseren Titrierungen scharf abgesetzt und der Trübungsgrad des ersten trüben Röhrchens entsprach der Intensität nach einer lysinfreien (nur mit Bakterien beimpften) Kontrolle. Bestanden irgendwelche Zweifel, so wurden die Röhrchen 1 Stunde lang im Wasserbad auf 57° C erhitzt und von dem auf solche Weise sterilisierten Inhalt kleine Mengen (eine Normalöse) auf Bouillon übertragen und diese Röhrchen mit einem Tropfen einer 14- bis 16stündigen Bouillonkultur beimpft. [Tatsächlich ergab sich, daß dieser *indirekte Lysinnachweis* in den geklärten Röhrchen stets positiv, in den trüb gebliebenen Röhrchen meist, aber nicht immer (siehe weiter unten) negativ ausfiel.] Dieser Vorgang *mußte* übrigens eingehalten werden, wenn die Beschaffenheit der zu untersuchenden Flüssigkeit (z. B. Blut) kein sicheres Urteil über den Trübungszustand der Röhrchen nach 8stündiger Bebrütung gestattete.

Der Übergang von Phagen aus dem Blut in den Liquor.

Lysinhaltige Bouillons von möglichst hohem bekanntem Titer (stärkste noch lytisch wirkende Verdünnung 10^{-8} oder 10^{-9}) wurden in Mengen von 5 ccm in die gestaute Ohrvene von Kaninchen injiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten Blut, Serum und Liquor auf den Lysingehalt geprüft. 1 ccm des durch Herzpunktion gewonnenen Blutes wurde in der oben angegebenen Weise mit Bouillon fortlaufend verdünnt und die Röhrchen mit dem sensiblen Bakterienstamm beimpft. In gleicher Weise wurde das Serum

titriert. Die Gewinnung des Liquors geschah nach der von *Plaut* angegebenen Methode durch Suboccipitalpunktion. Die Tiere wurden narkotisiert, wozu uns das Tiernarkotikum „Numal-Roche" der Firma Hoffmann-La Roche zur Verfügung stand. Nach Enthaarung und Joddesinfektion der Hautstelle unterhalb der Protuberantia occipitalis externa wurde unter maximaler Beugung des Kopfes der Liquor durch Einstich einer dicken Kanüle mit einer Spritze aus der Zisterne aspiriert. Man hat sorgfältig darauf zu achten, daß der Liquor kein Blut enthält, worauf bereits *Klieneberger* und *Winkler* in ihren Arbeiten hinwiesen; schon geringe Verunreinigungen mit dem lysinhaltigen Blut können einen Lysingehalt im Liquor vortäuschen (siehe weiter unten). Bisweilen gelang es nicht, einen ganzen Kubikzentimeter zu gewinnen. Dann wurde eben eine kleinere Menge (z. B. 0,5 ccm) mit der entsprechend kleineren Bouillonmenge vermischt (4,5 ccm), damit im 1. Röhrchen eine 10fache Verdünnung erreicht wurde.

Die Resultate sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Zahlen bezeichnen die Nummer des Grenzröhrchens und bedeuten den (negativen) Exponenten von 10 als Grad der eben noch lytisch wirkenden Lysinverdünnung. Die Entnahme von Blut, Serum und Liquor erfolgte in vier verschiedenen Zeitabständen nach der intravenösen Einverleibung des Ausgangslysins.

Tabelle 1 zeigt, daß der Phagengehalt von Blut und Serum eine halbe Stunde nach der Injektion am höchsten ist und daß er dann allmählich absinkt. Nach 24 Stunden ist meist kein Lysin mehr im Blut vorhanden. Noch später ausgeführte Titrationen ergaben regelmäßig ein negatives Resultat. Diese Befunde stimmen nicht überein mit den Angaben von *Werthemann*, wonach intravenös injizierte Bakteriophagen im Kreislauf des Warmblüters noch bis zum 5. Tag in Spuren nachweisbar waren. Worauf diese Differenz beruht, konnte vorläufig nicht entschieden werden.

Zeigte nur das unverdünnte Material lytische Eigenschaften, so wurde dieses Resultat mit der Zahl 0 auf der Tabelle vermerkt. Dieses Röhrchen enthielt einen Kubikzentimeter des unverdünnten Materials (Blut, Serum oder Liquor). In gleicher Weise wie die anderen Röhrchen wurde es mit dem lysosensibeln Bakterienstamm Coli S beimpft und 8 Stunden lang bebrütet. Ergab dann nach der Inaktivierung der qualitative Lysinnachweis das Vorhandensein von Lysin, während die 10fache Bouillonverdünnung keine lytischen Eigenschaften besaß, so war damit die durch die Methode erfaßbare kleinste Lysinmenge nachgewiesen.

In der Regel konnte in dem ersten trüb gebliebenen Röhrchen durch eine weitere Übertragung auf eine mit sensiblen Bakterien beimpfte Bouillon kein Lysin nachgewiesen werden. In einigen Fällen war dies aber möglich, was entweder auf mangelhafter Lyse oder vorzeitig eintretender Sekundärtrübung beruhte. In der Tabelle sind diese Befunde durch eingeklammerte Ziffern markiert, welche somit die Verdünnung angeben, in welcher das Lysin nicht bei der direkten Ablesung der Dilutionsserie, sondern erst durch eine weitere Übertragung (indirekt) festgestellt werden konnte.

Der verwendete Coliphage trat im Liquor nur eine halbe Stunde nach der intravenösen Injektion auf. Untersuchungen nach 3, 6 und 24 Stunden ergaben durchwegs negative Resultate. Der Phagentiter im Liquor belief sich in den positiven Fällen auf 0—1, d. h. der Nachweis gelang mit der benutzten Methode nur im unverdünnten oder 10fach verdünnten Liquor; nur in einem einzigen Falle wurde der Wert 2 beobachtet (siehe Tab. 1).

Tabelle 1. Lysingehalt von Blut, Serum und Liquor nach intravenöser Injektion.

		Blut				Serum				Liquor			
Stunden nach intravenöser Injektion:		1/2	3	6	24	1/2	3	6	24	1/2	3	6	24
Titer des intravenös injizierten Lysins: $10^{-8} = 8$	Kan. Nr. B 8	4		3						1			
	„ „ B 9					3 (4)	3			0	—		
	„ „ B 10	3	2	2	—					0			
	„ „ B 11		3								—		—
	„ „ B 12	3	3	2	—					0			
	„ „ B 13						2				—		
	„ „ B 14							2 (3)	—			—	
	„ „ B 15							1 (2)				—	
	„ „ B 17							1					
	„ „ B 23												—
	„ „ B 24												—
Titer des intravenös injizierten Lysins: $10^{-9} = 9$	Kan. Nr. B 4			4				2					
	„ „ B 5	4	3 (4)		1								
	„ „ B 6	4		2									
	„ „ B 7	4		3		2 (3)				1			
	„ „ B 18		3 (4)				1						
	„ „ B 20						1				—		
	„ „ B 21					2 (3)		1				—	
	„ „ B 25							0				–	
	„ „ B 28					3				0	—		
	„ „ B 29									2			
	„ „ B 30									1			
	„ „ B 34									0			
	„ „ B 35									0			
	„ „ B 36				—				—				—
	„ „ B 38										—		
	„ „ B 40								—				

Anmerkung: Die Zahlen geben den negativen Exponenten von 10 als Grad der lytischen Grenzverdünnung an. Der negative Lysinbefund ist durch — bezeichnet. Die leeren Rubriken entsprechen den nicht geprüften Positionen. Über die Bedeutung der eingeklammerten Ziffern gibt der Text Aufschluß.

Aus diesen Befunden würde sich ergeben: 1. daß der Phage nur dann im Liquor erscheint, wenn im Blute des Tieres eine genügend hohe Konzentration besteht, und 2. daß die Phagen aus dem Liquor binnen 3 Stun-

den wieder völlig verschwinden. Was den zweiten Punkt betrifft, konnte durch besondere Kontrollversuche gezeigt werden, daß die Phagen außerhalb des Tierkörpers im Liquor quantitativ unverändert haltbar sind, u. zw. mindestens durch 24 Stunden. Stellt man sich Verdünnungen einer phagenhaltigen Bouillon (eines Kulturlysates) von bekanntem Titer mit Liquor in Zehnerpotenzen her, so läßt sich leicht feststellen, daß jede dieser Verdünnungen, nach 3, 6 oder 24 Stunden in der üblichen Weise ausgewertet, den rechnungsgemäß zu erwartenden Titer gibt. Die Haltbarkeit im Liquor kann daher nicht durch die Beimischung von Bouillonsubstanzen bedingt sein, da diese durch die fortschreitende Verdünnung ausgeschaltet werden müssen; sie ist ferner von der Zeit (innerhalb des für die Hauptversuche in Betracht kommenden Intervalls) sowie von der Konzentration der Phagen im Liquor unabhängig.

Nun wurde bereits betont, wie wichtig es ist, bei der Entnahme des Liquors jede Verunreinigung mit Blut zu vermeiden. Eine Beimengung von Blut zur Liquorprobe im Verhältnis von 1 : 1000—2000 würde allerdings nicht unbemerkt bleiben. Wenn aber das Blut des Versuchstieres den Phagentiter von 4 oder mehr aufweist, dann würden auch noch kleinere Mengen, wenn sie in die Liquorprobe gelangen, einen positiven Phagenbefund im Liquor vortäuschen. Diese Fehlerquelle müßte sich ganz im Sinne der in Tabelle 1 zusammengestellten Versuchsresultate auswirken. Die Liquorbefunde würden scheinbar positiv sein, wenn die Phagenkonzentration im Blute hoch ist, und negativ werden, wenn der Lysinspiegel im Blute absinkt, und es wären im Liquor nur minimale Titer (0 oder 1) zu erwarten, da man die offensichtlich d. h. stärker mit Blut verunreinigten Proben naturgemäß verwirft. *Winkler* sowie *Kasahara* und *Ujeshima* konnten in ihren Versuchen allerdings einen höheren Gehalt des Liquors an Phagen feststellen und die Phagen blieben auch länger — bis zu 20 Stunden — nachweisbar. Da aber die durch intravenöse Injektion erzeugte Phagenkonzentration im Blute nach den Angaben dieser Autoren größer war als in den hier mitgeteilten Experimenten und demgemäß auch länger auf einem höheren Niveau verharrte, wäre eine entsprechende quantitative und zeitliche Verschiebung der positiven Liquorbefunde im Prinzip ebenfalls durch unbeabsichtigte Blutbeimischung erklärbar.

Gegen diese Deutung spricht jedoch die Konstanz der positiven Liquorbefunde, wie sie von uns und anderen Autoren erzielt wurden. Es ist unwahrscheinlich, daß in allen diesen Fällen eine Verunreinigung der Liquorproben mit Blut stattgefunden hatte. Prüft man ferner Tabelle 1 genauer, so kann man sich überzeugen, daß bei dem gleichen Phagentiter im Blute, nämlich 4, 3 (4) oder 3, sowohl positive als negative Resultate verzeichnet wurden; zumindest aus unseren Versuchen würde sich ergeben, daß nicht ausschließlich der Lysinspiegel im Blute maß-

gebend ist, sondern auch die seit der intravenösen Injektion verstrichene Zeit.

Daß die Phagenkonzentration im Liquor abnimmt, u. zw. nicht scheinbar (im Sinne der obigen Ausführungen), sondern tatsächlich, könnte als eine Art Parallelphänomen zum Absinken des Lysinspiegels im Blute aufgefaßt werden. Der Schwund intravenös injizierter Phagen aus der Zirkulation wurde von *A. Werthemann* auf Phagocytose der Phagenelemente durch weiße Blutzellen oder Reticulocyten, auf die Ausscheidung durch die Niere und den Darm und namentlich auf die Bindung (Adsorption) durch Organparenchyme bezogen. Im Subduralraum herrschen andere Verhältnisse als in der Blutbahn; die Möglichkeit des Abtransportes sehr kleiner Fremdelemente ist aber zweifellos vorhanden (vgl. *W. Löhr* und *W. Jakobi* und besonders die neueste zusammenfassende Darstellung der Liquorverhältnisse von *C. Weed*), ebenso die Bindung an freie und wandständige Zellen des vom Liquor erfüllten Raumes.

Es liegen bereits einige Erfahrungen über das Verhalten von Virusarten im Liquor vor. So wurde z. B. von *Bastai* und *Busacca* sowie von *S. Nicolau* und *P. Poincloux*, *Levaditi*, *Dufour*, *Souques* und *Poincloux* u. a. (siehe *S. Nicolau*, l. c., S. 320) Herpesvirus bei Menschen intralumbal injiziert. Nach *Nicolau* und *Poincloux* soll der Virusnachweis im Lumbalpunktat in der Regel nicht mehr gelingen, wenn nach der Injektion mehr als 8 Stunden verstreichen; in manchen Fällen konnte aber auch eine weit längere Verweildauer (in einem Falle von *Nicolau* und *Poincloux* sogar von 11 Tagen) festgestellt werden. Ferner soll sich Poliomyelitisvirus im Liquor von intrazisternal oder intralumbal geimpften Affen 5 Tage hindurch in nachweisbarem Zustande erhalten. Diese Daten sprechen nicht für einen so raschen Schwund, wie dies aus den in Tabelle 1 zusammengefaßten Versuchen hervorgehen würde. Man hat jedoch zu berücksichtigen, daß unter „Herpesvirus" oder „Poliomyelitisvirus" nicht Suspensionen von Viruselementen zu verstehen sind, sondern Verreibungen von virushaltiger Nervensubstanz (Hirnemulsionen). Auch könnten sich verschiedene Viruselemente (speziell pathogene und apathogene) verschieden verhalten.

Zur Klärung der Frage schien es somit notwendig, das Verhalten der Phagen im Liquor des lebenden Kaninchens zu untersuchen, u. zw. unter spezieller Berücksichtigung der quantitativen und zeitlichen Bedingungen, welche für die in Tabelle 1 wiedergegebenen Befunde in Betracht kommen. Zu diesem Zwecke wurde einer Reihe von Kaninchen je 0,1 ccm einer entsprechend verdünnten Phagensuspension in die Hinterhauptszisterne injiziert. Nach Ablauf von $^1/_2$, 3, 6, 24 Stunden wurde der Liquor entnommen und quantitativ auf seinen Lysingehalt untersucht. Über die Resultate gibt Tabelle 2 Auskunft; die Bedeutung der Zeichen ist der Anmerkung zu Tabelle 1 zu entnehmen.

Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse wäre vorerst zu berücksichtigen, daß der Liquor eines Kaninchens der verwendeten Größe etwa 1,0 ccm Volum hat, so daß durch die Injektion von 0,1 ccm Phagensuspension

rechnungsgemäß eine ungefähr 10fache Verdünnung resultieren würde. Hat die injizierte Phagensuspension, wie das in unseren Versuchen der Fall war, den Titer 2, 3 bzw. 5, so sollte der Liquor die Titer 1, 2 bzw. 4 annehmen, falls eine gleichmäßige Vermischung des Inoculums mit dem Liquor vorausgesetzt werden darf. Die Versuche mit den Lysinverdünnungen 2 und 3 konnten somit als eine gute Annäherung an die in Tabelle 1 dargestellten Verhältnisse betrachtet werden; die Injektion einer Lysinverdünnung vom Titer 5 wurde vorgenommen, um zu erkennen, wie sich die Resultate unter diesen Umständen ändern.

Tabelle 2. Lysingehalt des Liquors nach intrazisternaler Injektion.

		Anzahl der Stunden nach der intrazisternalen Injektion:			
		½	3	6	24
Titer der intrazisternal injizierten Lysinverdünnung $10^{-2} = 2$	Kaninchen Nr. L 3	1			
	„ „ L 4		—		
	„ „ L 5		—		
	„ „ L 15	1	—		
	„ „ L 16	1	—		
	„ „ L 17	2			
$10^{-3} = 3$	Kaninchen Nr. L 12	1	—		
	„ „ L 13	2	—	—	
	„ „ L 14	2			
$10^{-5} = 5$	Kaninchen Nr. L 7	2		—	
	„ „ L 8	2		—	
	„ „ L 10		2		—
	„ „ L 11		1		

Es zeigte sich also:

1. daß die Phagen, in mäßiger Konzentration in den Liquor gebracht, binnen längstens 3 Stunden vollständig verschwinden;

2. daß das völlige Verschwinden der Phagen aus dem Liquor auch nach der Injektion größerer Dosen zu beobachten ist, daß aber hierzu eine längere Zeit beansprucht wird (> 3 und < 6 Stunden);

3. daß der Nachweis von Phagen im Liquor nach intravenöser Injektion (Tab. 1) nicht durch Beimischung von Blut zu den Liquorproben erklärt werden kann, sondern auf den Übertritt der Phagen aus der Blutzirkulation in den Liquor zu beziehen ist.

Die Schnelligkeit des Übertrittes aus dem Blut in den Liquor ist überraschend, besonders wenn man erwägt, daß kürzere Intervalle zwischen intravenöser Injektion und Entnahme des Liquors als 30 Minuten nicht geprüft wurden. Ferner sieht man ein, daß sich der Phagentiter im Liquor offenbar aus zwei Summanden mit entgegengesetzten Vorzeichen

zusammensetzt, nämlich dem *Übertritt in den Liquor* und dem *Schwund der Phagen* aus demselben. Es läßt sich daher — zumindest auf Grund der hier mitgeteilten Daten — nicht mit Sicherheit entscheiden, ob der Übertritt aus dem Blute in den Liquor nur in Form eines einzigen Schubes stattfindet, oder ob man an einen kontinuierlichen Vorgang zu denken hat, der aber nach kurzer Zeit nicht mehr nachweisbar ist, weil er durch das rasche Verschwinden der Phagen aus dem Liquor kompensiert wird. Unklar bleibt auch zunächst der Mechanismus des Phagenschwundes aus dem Liquor sowie die schon an anderer Stelle unterstrichene Frage, ob die ermittelten Verhältnisse für verschiedene Phagen und besonders auch für Phagen von verschiedenem Kaliber gelten.

Es sind Versuche im Gang, um diese Lücken auszufüllen. Eine genauere Analyse des Phagenschwundes aus dem Liquor könnte zur Kenntnis der Strömungsverhältnisse des Liquors beitragen und wäre auch geeignet, die Tatsache aufzuklären, daß Affen nach intrazisternaler Injektion von Poliomyelitisvirus ebenso sicher erkranken wie nach intracerebralen Impfungen und daß die primäre Lokalisation des Virus bei beiden Übertragungsarten im Lendenmark erfolgt (*E. W. Hurst*).

Zur Passage der Coliphagen durch die Placenta.

Methodik. Es wurden trächtige Kaninchen und Meerschweinchen verwendet, die sich in der Endphase der Gravidität befanden. Den Kaninchen wurden je 5 ccm eines Kulturlysats (Titer 10) in eine Ohrvene eingespritzt, den Meerschweinchen 1,5—3,5 ccm in eine freigelegte Jugularis. 30 Minuten bis 6 Stunden nach der Phageneinspritzung wurden die Tiere in Narkose laparotomiert und entnommen: 1. mütterliches Blut; 2. Fruchtwasser durch Aspiration aus der Fruchtblase mit einer Glaskapillare oder einer Spritze; 3. fetales Blut aus dem Herzen der extrahierten und aufgespannten Feten, wobei die Verunreinigung mit mütterlichem Blut sicherer vermieden werden konnte als durch Entnahme aus der Nabelschnur; 4. in Anlehnung an *Nakagawa* fetale Organe, u. zw. Leber und Milz.

Im mütterlichen und im fetalen Blut sowie im Fruchtwasser wurden die Phagen mit Hilfe der bereits bei den Liquorversuchen besprochenen Technik festgestellt bzw. ausgewertet. Die fetalen Organe wurden verrieben und in Bouillon suspendiert, in welcher nach Beimpfung mit lysosensiblem Coli und 8stündigem Aufenthalt bei 37° C der Phagennachweis qualitativ vorgenommen wurde.

Die Resultate (siehe Tab. 2) zeigen:

1. daß das fetale Blut in sämtlichen Kaninchenversuchen frei von nachweisbarem Lysin war;

2. daß im Blut der Meerschweinchenfeten Lysin festgestellt werden konnte, jedoch nur in einem Teil der Versuche. Der Titer war in den positiven Fällen nie höher als 1.

Tabelle 3. Lysingehalt des Fruchtwassers, des mütterlichen und fetalen Blutes nach intravenöser Injektion.

I. Versuche an graviden Kaninchen.

Stunden nach der intravenösen Injektion	Menge des Ausgangslysins	Größte eben noch lytisch wirkende Verdünnung des Ausgangslysins	Mutterblut	Fetalblut	Fruchtwasser	Organe des Fetus (Leber, Milz)
$^1/_2$—1	5 ccm	$10^{-10} = 10$	4	—	a : 0 b : 1	—
		$10^{-10} = 10$	5	—	2	—
		$10^{-9} = 9$	4	a : — b : —	a : — b : 0	—
3	5 ccm	$10^{-9} = 9$	4	a : — b : — c : —	a : — b : —	—
6	5 ccm	$10^{-9} = 9$	3	—	—	—
		$10^{-8} = 8$	3	—	—	—

II. Versuche an graviden Meerschweinchen.

$^1/_2$—1	$1^1/_2$ ccm	$10^{-10} = 10$	5	1	a : 1 b : 2	—
		$10^{-10} = 10$	4	—	—	—
	2 ccm	$10^{-9} = 9$	5	a : — b : — c : 1	a : — b : — c : —	—
	2 ccm	$10^{-10} = 10$	4	a : — b : — c : —	2	—
	3 ccm	$10^{-9} = 9$	7	a : 0 b : 1 c : —	a : — b : — c : — d : —	—
	$3^1/_2$ ccm	$10^{-8} = 8$	7	a : — b : 0 c : —	a : 0 b : 0	—
3	2 ccm	$10^{-8} = 8$	3	a : — b : —	a : — b : —	—
6	$1^1/_2$ ccm	$10^{-9} = 9$	2	—	a : — b : —	—

3. Im Fruchtwasser fanden sich Phagen sowohl bei Kaninchen als bei Meerschweinchen, zuweilen in etwas höherer Konzentration als im fetalen Blut (Titer = 2), aber nur in der Minderzahl der Experimente. In einigen

Fällen ergaben die Untersuchungen von Fruchtwasser und fetalem Blut diskordante Ergebnisse.

4. Konnten im gleichen Fall mehrere Proben desselben Materials entnommen und auf ihren Phagengehalt geprüft werden, so waren die Resultate nicht immer gleichsinnig, sondern zum Teil negativ, zum Teil positiv.

5. Positive Befunde im Fruchtwasser oder im fetalen Blut wurden nur 30—60 Minuten nach der intravenösen Injektion des Muttertieres erzielt, also zur Zeit des hohen Lysinspiegels im mütterlichen Kreislauf.

6. In den Organen der Feten konnten die Phagen nie nachgewiesen werden, auch wenn die Untersuchung des fetalen Blutes ein positives Resultat ergab.

Zusammenfassung.

1. In Versuchen an Kaninchen konnte in teilweiser Bestätigung früherer Angaben gezeigt werden, daß intravenös injizierte Coliphagen innerhalb einer kurzen Frist in den Liquor übertreten und aus demselben rasch wieder verschwinden.

2. Der Schwund der Phagen aus dem Liquor läßt sich nicht darauf zurückführen, daß der Liquor die Phagen abtötet (inaktiviert); die geprüften Phagen waren vielmehr in vitro im Liquor ohne jede Einbuße ihrer Wirksamkeit haltbar.

3. Der Schwund der Phagen aus dem Liquor erfolgt somit nur im lebenden Tier. Der Vorgang kann quantitativ und als Funktion der Zeit untersucht werden, wenn man verschiedene Phagenkonzentrationen intrazisternal einspritzt und den Phagengehalt des Liquors nach abgestuften Intervallen titriert. Nach Injektion größerer Phagenmengen beansprucht die vollständige Eliminierung der Phagen aus dem Liquor längere Zeit.

4. Der Phagenspiegel, der nach intravenöser Injektion im Liquor festgestellt werden kann, ist die Resultierende aus zwei Prozessen, der Zufuhr von Phagen aus dem Blute und ihrem Schwunde aus dem Liquor.

5. Injiziert man trächtigen Kaninchen oder Meerschweinchen Phagen intravenös, so gelingt in manchen Fällen der Nachweis im Fruchtwasser oder im Herzblut der Feten. Positive Befunde wurden jedoch nur 30 bis 60 Minuten nach der Einbringung der Phagen in den mütterlichen Kreislauf erzielt.

Literatur.

[1] *Bastai* u. *Busacca:* Über die Pathogenese des Herpes febrilis. Klin. Wschr. **3**, 147 (1924). — [2] *Blair* and *Reeves:* The placental transmission of bacteriophage. J. infect. Dis. (Am.) **42**, 440 (1928). — [3] *Calmette, A.:* L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et chez les animaux, 3. Ed., S. 295. Paris, 1928. — [4] *Doerr, R.:* Die Lehre von den Infektionskrankheiten in allgemeiner Darstellung. Lehrbuch der inneren Medizin, 3. Aufl. S. 67—165: Julius Springer, 1936. — [5] *Doerr, R.* u. *R. Pick:* Untersuchungen über das

Virus der Hühnerpest. Zbl. Bakter. usw., I Orig. **76**, 476 (1915). — [6] *Doerr, R.* u. *S. Seidenberg:* Der quantitative Virusnachweis. Handbuch der Virusforschung, II. Teil (im Druck). — [7] *Elford, W. J.:* The sizes of viruses and bacteriophages, and methods for their determination. Handbuch der Virusforschung, I. Teil, S. 126ff. 1938. — [8] *Elford* and *Andrewes:* The sizes of different bacteriophages. Brit. J. exper. Path. **13**, 446 (1932). — [9] *Grasset:* Recherches sur le passage du Bactériophage à travers la plazenta. C. r. Soc. Biol. **96**, 839 (1927). — [10] *Hoegger, D.:* Versuche über Bakteriophagenvermehrung in Ultrafiltraten. Z. Hyg. usw. **121**, 465 (1939) (im Druck). — [11] *Hurst, E. W.:* The spread of poliomyelitis virus by the axis-cylinders. Vol. jubil. *G. Marinesco*, 1933. — [12] *Kasahara* u. *Uyeshima:* Der Übergang der Bakteriophagen vom Blut in den Liquor. Zbl. Bakter. usw., I Orig. **136**, 143 (1936). — [13] *Klieneberger:* Passage von Bakteriophagen innerhalb des Organismus. Zbl. Bakter. usw., I Orig. **122**, 168 (1931). — [14] *Krueger, A. P.:* A method for the quantitative determination of bacteriophage. J. gen. Physiol. (Am.) **13**, 553 (1930). — [15] *Naito, R.:* Ein neues Verfahren zum Nachweis des bakteriophagen Lysins. Zbl. Bakter. usw., I Orig. **136**, 152 (1936). — [16] *Nakagawa, T.:* Über die Durchgängigkeit der Placenta für verschiedene Mikroorganismen und Bakteriophagen. Zbl. Bakter. usw., I Orig. **136**, 147 (1936). — [17] *Nattan-Larrier, Eliava* et *Richard:* Bactériophage et perméabilité placentaire. C. r. Soc. Biol. **106**, 794 (1931). — [18] *Nicolau, S.:* Herpès. Les ultravirus des maladies humaines, ed. *C. Levaditi* et *P. Lépine*, S. 297ff. Paris, 1938. — [19] *Nicolau, S.* et *P. Poincloux:* Présence du virus encephalitique dans le liquide cephalorachidien. Brux. méd. **4**, 1104 (1924). — [20] *Northrop, J. H.:* Concentration and purification of bacteriophage. J. gen. Physiol. (Am.) **21**, 335 (1938). — [21] *Paic, Krassnoff, Haber, Reinie* et *Voët:* Dimensions approximatives des ultravirus et des bacteriophages d'après les données fournies par l'ultrafiltration. Ann. Inst. Pasteur, Par. **60**, 227 (1938). — [22] *Weed, L. H.:* Meninges and cerebrospinal fluid. J. Anat. (Brit.) **72 II**, 181 (1938). — [23] *Werthemann, A.:* Das Verhalten der übertragbaren Lysine („Bakteriophagen") in der Zirkulation von Kalt- und Warmblütern. Arch. Hyg. (D.) **91**, 255 (1922). — [24] *Winkler:* Über die Durchlässigkeit der Blut-Liquor-Schranke für Bakteriophagen bei vakzinierten Kaninchen. Z. Immunit.forsch. **73**, 185 (1931).